

LABORATORIO DE BIOLOGIA DEL COM- PORTAMIENTO

Modelo experimental de lesión medular sacra en ratas: correlatos clínicos y electrofisiológicos del segmento metamérico afectado

Experimental model of spinal lesion in rats: clinical and electrophysiological correlates in the metameric affected segment.

Modelo experimental de lesão medular sacra em camundongos: correlatos clínico e eletrofisiológicos do segmento metamérico afetado.

Francisco Mannará^{1,2}, Enrique Segura¹, Silvina Figuerelli², Héctor Coirini¹, Alberto Yorio^{1,2}

1. Hospital de Agudos Juan A. Fernández (GCABA).
2. Instituto de Biología y Medicina Experimental (CONICET).

Resumen

La lesión experimental de la médula espinal a nivel sacro en la rata produce un modelo animal con baja morbilidad respecto a los investigados con lesiones de la médula espinal a nivel torácico. La descripción y cuantificación de la espasticidad clínica en la cola de la rata causada por la lesión de la médula espinal sacra es escasa en la bibliografía. Por otro lado, no hay investigaciones acerca de las correlaciones entre el grado de espasticidad en la cola de rata y parámetros electrofisiológicos, por lo que nuestro objetivo es estudiar la espasticidad de la cola con estudios clínicos y electromiográficos. Se realizaron cirugías espinales experimentales en 10 ratas Sprague Dawley. El nivel sacro fue elegido para producir la espasticidad sólo en la cola. En el tiempo postoperatorio se evaluó la cola buscando signos de espasticidad, como paresia e hipertonía, y el grado de espasticidad se categorizó utilizando una escala cuantitativa del tono muscular. Además, se realizaron estudios de electromiografía para obtener respuesta de los músculos de la cola por estimulación del nervio caudal (ondas M y F). Luego, los animales fueron sacrificados y perfundidos. Las lesiones de médula espinal fueron verificadas con histopatología. Todos los animales con lesión medular presentaron paresia de la cola. Los signos de espasticidad se iniciaron en la segunda semana del estudio. En relación con la escala de tono muscular cinco ratas presentaron espasticidad de grado 2, tres ratas espasticidad de grado 4, y sólo una espasticidad de grado 3. La electrofisiología mostró patrones de respuesta en relación con la evo-

lución clínica y el grado de espasticidad. Los resultados obtenidos muestran la correspondencia entre el grado de espasticidad y los patrones electrofisiológicos causado por el grado de excitabilidad de las motoneuronas del segmento espinal afectado. Este modelo experimental que permite hacer una evaluación clínica y de la correspondencia con la electrofisiología con la menor morbilidad general provocada por la lesión de médula espinal.

Palabras clave: lesión espinal * espasticidad * electromiografía

Summary

The experimental sacral spine lesion in the rat produce an animal model with low morbidity than those with thoracic spinal lesions. The clinical spasticity quantification in the tail of the rat caused by sacral cord lesion was poorly described in the bibliography. Furthermore, there are no investigations about the relationship between electrophysiological parameters and the grade of spasticity in the rat tail, so our purpose is to evaluate tail spasticity with clinical and electromyographic studies. Experimental spinal surgeries were done in 10 Sprague Dawley rats. Sacral level was chosen to produce spasticity only in the tail. On the postoperative time the tail was evaluated searching signs of spasticity, such as paresia and hypertonia, and then the grade of spasticity was categorized using a muscular tone quantitative scale. On the other hand, electromyographic studies were done to obtain the muscular responses of the tail to the caudal nerve stimulation (M, F and waves). Then, the specimens were sacrificed and perfused. Spinal cord lesions were verified with histopathology. All the animals with spinal lesion presented paresia of the tail. The spasticity signs began at the second postoperative week. In relationship with the muscular tone scale five rats presented grade 2 spasticity, three rats grade 4 spasticity, and only one grade 3 spasticity. The electrophysiology showed patterns of response in relation with the clinical evolution and the grade of spasticity. The results obtained showed correspondence between the grade of spasticity and the electrophysiological patterns caused by the grade of the motoneuron excitability. This experimental model allows to make a clinical evaluation and the correspondence with the electrophysiology, with the lowest general morbidity.

Key words: spinal injury * spasticity * electromyography

Resumo

A lesão experimental da medula espinhal a nível sacro no camundongo produz um modelo animal com baixa morbilidade a respeito dos pesquisadores com lesões da medula espinhal a nível torácico. A descrição e quantificação da espasticidade clínica na cauda do rato causada pela lesão da medula espinhal sacra é escassa na bibliografia. Por outro lado, não há pesquisas acerca das correlações entre o grau de espasticidade na cauda do rato e parâmetros eletrofisiológicos, portanto o nosso objetivo é estudar a espasticidade da cauda com estudos clínicos e eletromiográficos. Foram realizadas

cirurgias espinhais experimentais em 10 ratos Sprague Dawley. O nível sacro foi escolhido para produzir a espasticidade só no rabo. No tempo pós-operatório foi avaliado o rabo na procura de sinais de espasticidade, como paresia e hipertonia, e o grau de espasticidade se categorizou utilizando uma escala quantitativa do tom muscular. Além disso, foram realizados estudos de eletromiografia para obter resposta dos músculos da cauda por estimulação do nervo caudal (ondas M e F). Depois, os animais foram sacrificados e perfundidos. As lesões de medula espinhal foram verificadas com histopatologia. Todos os animais com lesão medular apresentaram paresia da cauda. Os sinais de espasticidade foram iniciados na segunda semana do estudo. Em relação à escala de tom muscular cinco ratos apresentaram espasticidade de grau 2, três ratos espasticidade de grau 4, e só um espasticidade de grau 3. A eletrofisiologia mostrou padrões de resposta com relação à evolução clínica e o grau de espasticidade. Os resultados obtidos mostram a correspondência entre o grau de espasticidade e os padrões eletrofisiológicos causados pelo grau de excitabilidade dos motoneurônios do segmento espinhal afetado. Este modelo experimental permite fazer uma avaliação clínica e da correspondência com a eletrofisiologia com a menor morbidade geral provocada pela lesão de medula espinhal.

Palavras chave: lesão espinhal * espasticidade * eletromiografia

Introducción

Las alteraciones clínicas y fisiopatológicas provocadas por lesión traumática de la médula espinal son el resultado no sólo de la lesión primaria propiamente dicha, sino también de la conjunción de factores inflamatorios, necrosis hemorrágica progresiva, destrucción neuronal, proliferación glial y trastorno vascular, conocidas como lesiones secundarias y terciarias (1). Los modelos animales experimentales de lesión medular constituyen una herramienta útil para la investigación de los mecanismos fisiopatológicos involucrados y los posibles procedimientos terapéuticos. En la bibliografía se describen los efectos clínicos de la lesión medular experimental en ratas así como también hallazgos electrofisiológicos observados en los niveles afectados. Sin embargo, las descripciones se refieren generalmente a los efectos producidos por lesiones en el nivel torácico de la médula espinal y es infrecuente el estudio de las correlaciones entre los hallazgos clínicos y los electrofisiológicos (2) (3).

En este estudio se utiliza un modelo experimental de lesión espinal en la rata albina Sprague Dawley a nivel del segmento medular sacro, porque en este modelo se puede observar los efectos clínicos de la lesión espinal a nivel de la cola del animal con menor morbidez, ya que se evita el compromiso esfinteriano y de la locomoción. El objetivo es el de correlacionar los efectos clínicos y electrofisiológicos de la lesión medular.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 14 ratas macho Sprague-Dawley (250-300 gramos), procedentes del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, CONICET). La lesión medular se realizó en 10 animales; las restantes correspondieron al grupo control: 1 rata con lesión falsa y 3 ratas sin lesión.

Procedimientos quirúrgicos

Las cirugías se realizaron con anestesia profunda con mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xylazina (10 mg/kg, i.p.), manteniendo la temperatura corporal a 37 °C. El control del sangrado se efectuó con Gelfoam. En distintos animales se utilizaron dos procedimientos: a) Lesión falsa, en la se efectuó sección de tejidos blandos, laminectomía posterior sin apertura de la duramadre y sutura. b) Lesión de médula espinal (LME), utilizando microscopio quirúrgico, laminectomía posterior en nivel L1-2 (correspondiente a la metámera S1 de la médula espinal), apertura de la duramadre y transección de médula espinal con tijera de iridectomía, con posterior sutura de duramadre y tejidos blandos.

Estudios clínicos

El estado general y el tono muscular y la motilidad activa de la rata se examinaron en forma diaria. Se evaluó particularmente el segmento de la cola por medio de la inspección, la motilidad pasiva y la respuesta a estímulos táctiles. Para cuantificar el grado de compromiso del tono muscular de la cola se utilizó una escala diseñada por los investigadores (Tabla I).

Tabla I. Grados de alteración del tono muscular, en categorías según signos clínicos observados en el examen físico de la cola.

Grado	Categoría	Signos clínicos
0	Cola atónica	Flexibilidad marcada y escasa resistencia a la movilización pasiva.
1	Cola tónica normal	Flexibilidad habitual y resistencia perceptible a movilización pasiva.
2	Cola hipertónica sin espasmos	Actitud rectificadora esporádica y resistencia marcada a la movilización pasiva.
3	Cola hipertónica con espasmos	Espasmos laterales transitorios (segundos de duración) espontáneos o por estimulación táctil.
4	Cola hipertónica con actitud anómala permanente	Cambio permanente de actitud de la cola (curvada en forma de S).

Estudios electrofisiológicos

Los registros se realizaron bajo anestesia ligera con ketamina (60 mg/kg), a la 1^a, 2^a, 3^a y 4^a semana de realizada la LME. En músculo de la cola mediante electrodo coaxial se registraron los potenciales compuestos de acción muscular provocados por estimulación con electrodos subcutáneos del nervio caudal. Se detectaron una onda de corta latencia (respuesta M) y una onda de latencia tardía (respuesta F). Se midieron latencia en milisegundos y amplitud en milivolts de ambas ondas. La estimulación del nervio caudal se efectuó a 1, 2, 4 y 8 hertz a fin de evaluar los efectos de la estimulación repetitiva sobre la excitabilidad del segmento de médula espinal sacro. Se computaron las amplitudes porcentuales de la respuesta H respecto a la amplitud máxima obtenida a frecuencias de estimulación de 0.25 hertz. Se confeccionaron curvas de amplitud porcentual en función de la frecuencia de estimulación.

Estudios histológicos

Los animales fueron sacrificados en forma incruenta en la cuarta semana posterior al inicio de las evaluaciones. La médula espinal fue removida y el segmento medular caudal a S1, disecado y fijado en formol al 10% durante 48 horas. Posteriormente se analizaron los resultados obtenidos para determinar el grado de lesión en los diferentes niveles de la médula espinal sacra, tanto proximales como distales al sitio de sección.

Resultados

Las 10 ratas con LME (100%) presentaron hipotonía y parálisis total de la cola inmediatamente distal a la lesión medular. La duración de la fase aguda o de hipotonía fue variable, entre 1 y 4 días después de la lesión. Además, en 3 ratas se observó una leve paresia en alguna de las extremidades posteriores, transitoria, con recuperación ad-integrum luego de la primera semana posoperatoria. Los hallazgos clínicos a nivel de la cola fueron marcadamente distintos de acuerdo al tiempo transcurrido posterior a la cirugía, por lo que se consideraron dos etapas desde el punto de vista clínico: la etapa aguda, correspondiente a la primera semana posquirúrgica, y la etapa crónica, correspondiente a la evolución a partir de la segunda semana posquirúrgica. Las exploraciones electrofisiológicas realizadas durante la fase aguda de la lesión medular permitieron observar que las respuestas electromiográficas de la cola a la estimulación del nervio caudal fueron en general respuestas M y F de incidencia, configuración y amplitud variables, con predominio de la disminución de las amplitudes. Una de las ratas con LME falleció dentro de la primera semana posquirúrgica.

Como se consignó previamente, luego de la segunda semana postoperatoria se manifestaron signos claros de incremento del tono muscular de la cola. De acuerdo con la escala de espasticidad utilizada, 5 ratas (55%) presentaron espasticidad grado 2, una (11%) grado 3 y las otras 3 restantes (33%) espasticidad grado 4. Los registros electrofisiológicos realizados en la fase crónica mostraron que los parámetros de la respuesta M fueron constantes. A diferencia de lo observado en los animales del grupo control, las curvas de amplitud porcentual respecto a la frecuencia de estimulación fueron menos pronunciadas en los animales con LME, por menor variación en la amplitud de la respuesta F. En las ratas con mayor grado de espasticidad (grados 3 y 4) las respuestas F prácticamente no presentaron variaciones de amplitud a las distintas frecuencias de estimulación.

La histología permitió corroborar la existencia de sección completa medular a nivel de S1 y varias anomalías histológicas en los segmentos adyacentes a la zona lesionada: degeneración neuronal (vacuolización del neuropilo), y astrogliosis.

Discusión y Conclusiones

La lesión medular experimental en ratas se asocia a cambios clínicos y electrofisiológicos distintos según el tiempo transcurrido desde la lesión. En la primera semana posterior a la lesión existe un cuadro de parálisis flácida, hipotonía y arreflexia de la cola, que se asocia a una disminución de las respuestas electromiográficas respecto a los animales controles. Luego de la segunda semana se pueden observar signos clínicos de hipertonía en los músculos de la cola de las ratas lesionadas y cambios correlativos en las respuestas electromiográficas a la estimulación. Estos resultados son coincidentes con lo reportado por otros autores, que describen parálisis muscular e hipotonía de la cola en el período temprano posterior a la lesión medular, asociadas a la ausencia o variabilidad de las respuestas electromiográficas, e hipertonía de la cola en relación a salvas de actividad electromiográfica en los períodos posteriores (4).

Nuestros resultados también concuerdan con los de otros investigadores respecto a la posibilidad de evaluar en un modelo animal de lesión medular el grado de tono muscular del segmento corporal afectado por LME en forma cuantitativa por medio de una escala de espasticidad (5). En la bibliografía también se menciona que hay diferencias en la respuesta electromiográfica tardía de los animales con lesión medular respecto a los controles; esto se atribuye a un aumento de la excitabilidad de las motoneuronas, resultante de la sección de las vías descendentes en la médula espinal (11) (12). A diferencia de estos trabajos, que estudian la onda electromiográfica tardía en la pata trasera en modelos de lesión medular en niveles más altos (6) (11) (13-16), nuestros

resultados muestran efectos de la onda electromiográfica tardía en la cola del animal en un modelo de lesión medular sacra. Estos resultados sugieren la validez del modelo experimental propuesto, con menor morbilidad e invasión sobre la integridad física y comportamental del los animales.

Desde el punto de vista fisiopatológico, se considera que ambas fases clínicas (hipotonía y espasticidad), son el resultado de alteraciones del balance entre los mecanismos inhibitorios y excitatorios que normalmente actúan sobre las motoneuronas. En la fase aguda existe un evidente defecto de los mecanismos excitatorios sobre las motoneuronas ubicadas en el segmento medular distal a la lesión. En la fase crónica, la recuperación de los mecanismos excitatorios se expresa mediante la reaparición y aumento de la reactividad neuromuscular. Además, la lesión medular interrumpe las influencias inhibitorias que provienen del tronco cerebral proyectándose a través de los fascículos laterales de la médula espinal. De esta manera, los aminoácidos monoamínicos no llegan a ejercer su influencia moduladora sobre las interneuronas y motoneuronas espinales. En estas condiciones, la desinhibición medular resulta en un aumento de la excitabilidad de las motoneuronas, que se presenta como un incremento de la descarga de los potenciales de acción de las fibras musculares en respuesta a la estimulación.

Referencias bibliográficas

1. Coutts M, Keirstead HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008; 209: 368-77.
2. Bennett DJ, Sanelli L, Cooke CL, Harvey PJ, Gorassini MA. Spastic longlasting reflexes in the awake rat after sacral spinal cord injury. *J Neurophysiol* 2004; 91: 2247-58.
3. Yorio A, Mannara F, Pennisi P, Figurelli S, Segura E. Changes in the F-wave of sacral segments by spinal cord injury in rats: clinical, histological and biochemical correlates. *Clinical Neurophysiology* 2008; 119: S172.
4. Li Y, Harvey PJ, Li X, Bennett DJ. Spastic long-lasting reflexes of the chronic spinal rat studied *in vitro*. *Journal of Neurophysiol* 2004; 91:2236-46.
5. Harris RL, Putman CT, Rank M, Sanelli L, Bennett DJ. Spastic tail muscles recover from myofiber atrophy and myosin heavy chain transformations in chronic spinal rats. *J Neurophysiol* 2007; 97: 1040-51.
6. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma* 2006; 23: 635-59.
7. Gelderd JB, Chopin SF. The vertebral level of origin of spinal nerves in the rat. *Anatomical Record* 1977; 188: 45-7.
8. Mannará F, Figurelli S, Pennisi P, Segura E, Yorio A. Lesión experimental de la médula espinal sacra en la rata y correlato clínicoelectrofisiológico. *Medicina* 2008; 68 Supl II: 146.
9. Kakinohana O, Hefferan MP, Nakamura S, Kakinohana M, Galik J, Tomori Z, *et al*. Development of GABA-sensitive spasticity and rigidity in rats after transient spinal cord ischemia: a qualitative and quantitative electrophysiological and histopathological study. *Neuroscience* 2006; 141: 1569-83.
10. Joynes RL, Janjua K, Grau JW. Instrumental learning within the spinal cord: VI. The NMDA receptor antagonist, AP5, disrupts the acquisition and maintenance of an acquired flexion response. *Behavior Brain Res* 2004; 154: 431-8.
11. Carp JS, Tennissen AM, Chen XY, Wolpaw JR. H-reflex operant conditioning in mice. *J Neurophysiol* 2006; 96: 1718-27.
12. Lee BH, Lee KH, Kim UJ, Yoon DH, Sohn JH, Choi SS, *et al*. Injury in the spinal cord may produce cell death in the brain. *Brain Research* 2004; 1020: 37-44.
13. Kim Y, Aoki T, Ito H. Evaluation of parameters of serially monitored F-wave in acute cervical spinal cord injury. *J Nippon Med Sch* 2007; 74: 106-13.
14. Gosgnach S, Lanuza GM, Butt SJ, Saueressig H, Zhang Y, Velasquez T, Riethmacher D, Callaway EM, Kiehn O, Goulding M. V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* 2006; 440: 215-9.
15. Chen Y, Chen XY, Jakeman LB, Chen L, Stokes BT, Wolpaw JR. Operant conditioning of H-reflex can correct a locomotor abnormality after spinal cord injury in rats. *J Neuroscience* 2006; 26: 12537-43.
16. Carp JS, Tennissen AM, Chen XY, Wolpaw JR. Diurnal H-reflex variation in mice. *Experimental Brain Research* 2006; 168: 517-28.